

学 位 論 文 題 名

日本人アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子 変異と皮膚バリア機能障害に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 2006 年表皮バリア関連蛋白で、顆粒層のケラトヒアリン顆粒の主成分であるフィラグリンの遺伝子(*FLG*)変異がアトピー性皮膚炎 (AD) の重要な発症因子であることが示された。また皮膚バリア機能評価法として TEWL(transsepidermal water loss:経表皮水分蒸散量) および角質水分量が用いられており、各々電気的な湿度測定機器の利用により、生理的な条件下で非侵襲的に表皮バリア機能を測定することができる。本研究の目的は、1)AD 患者において *FLG* 変異を有することによる角層バリア機能への影響について調査すること、2)日本人 AD 患者における *FLG* 変異の検索、3) *FLG* 変異が患者皮膚においてどのようにフィラグリンの生成に関係するかを調べることである。

【対象と方法】 1. *FLG* 変異を有する患者、有さない患者で皮膚バリア機能障害を測定 *FLG* 変異を有する AD 患者、同遺伝子変異を有さない AD 患者を各 12 人抽出した。国際的重症度基準 OSCORAD (objective severity scoring of AD, score range 0-83) を重症度の判定基準に用いて、各々の患者の臨床的重症度を調べた。加えて詳細な問診と採血による特異アレルゲン検査を施行した。

次に臨床的に皮疹がない前腕屈側、伸側、背部の 3 か所から TEWL、角質水分量、皮膚厚を 3 回ずつ測定し、平均をとった。角質水分量と角質厚は Corneometer ASA-M2 (ASAHI BIOMED, Yokohama, Japan) を、TEWL は Evaporimeter AS-TW1 (ASAHI BIOMED, Yokohama, Japan) を用いて測定した。

2. AD 患者におけるフィラグリンの発現の検討

同意の得られた患者には皮膚生検を施行し、filaggrin repeat を検出可能な抗フィラグリン抗体 (mouse mAb 15C10[®], Novocastra 社) による免疫組織化学染色を行った。

3. 新規変異と日本人 AD 患者における *FLG* 変異のスクリーニング

FLG の繰り返し配列をシークエンス可能なプライマーを用いて、新たに 19 人の日本人 AD 患者 *FLG* 変異をスクリーニングした。計 137 人の日本人 AD 患者と 134 人の一般コントロールの末梢血から DNA を採取し、新たに発見した変異の有無を検索した。

4. 新規 *FLG* 変異を有する患者でのフィラグリン mRNA 量の検討

新たに発見した *FLG* 変異を有する患者皮膚において、real-time reverse transcription-PCR 法を用いて mRNA 発現量を測定した。

【結果】 1. *FLG* 変異を有する群も有さない群も皮膚バリア機能は低下していた。

FLG 変異を有する群も、有さない群も角質水分量は減少していた。そして、角質水分量はフィラグリン変異を有する群は有さない群に比べてわずかに低下していたが、統計学的有意差を認めなかった。それに対して TEWL は変異を有さない群が、変異を有する群よりも有意に上昇していた。

2. *FLG*変異を有する群のみアトピーの臨床学的重症度と TEWL との間には正の相関を認めた。

FLG 変異を有する群では、アトピーの臨床学的重症度 OSCORAD と角質水分量との間には負の相関、アトピーの臨床学的重症度と TEWL との間には正の相関を認めた。しかし、変異を有さない群ではそれらの相関は全く認めなかった。

3. *FLG*変異を有する患者では角質肥厚と顆粒層の低形成を認めた。

患者皮膚を用いた組織学的な検討では、*FLG* 変異を有する群では、変異を有さない群よりも皮膚厚の増加を認めた。それと同時に *FLG* 変異のため、プロフィラグリンを主要な構成成分とするケラトヒアリン顆粒は低形成となっていた。

4. *FLG*変異を有する群のみ臨床的重症度とダニ、ハウスダスト、ネコ上皮抗原特異 IgE 値は相関していた。

FLG 変異を有する AD では臨床的重症度とダニ、ハウスダスト、ネコ上皮抗原特異 IgE とに正の相関を認めた。この傾向は変異を有さない群では認められなかった。

5. 新規 *FLG* 変異 p.Lys4022X が同定された。

新規の日本人 AD 患者において新規の遺伝子変異 p.Lys4022X を認めた。この変異はフィラグリン遺伝子のリピート配列の最終リピートの 11 番目にあり、現在報告された変異で最も C 末端寄りの変異であった。

6. 今回同定した新規変異を含め日本人 AD 患者の 27% に *FLG* 変異を認めた。

137 人の AD 患者でこの新規変異をスクリーニングしたところ、2.9% に認めた。健常コントロール 134 人には同変異を有する者はいなかった。過去の報告と合わせて、AD 患者の約 27% が *FLG* 変異を有していた。一般コントロール群と比べアトピー患者群では統計学的に有意に変異の保有率が高いことが示された ($\chi^2 p = 6.5 \times 10^{-6}$)。

7. 新規変異 p.Lys4022X を有する患者の皮膚から抽出した *FLG* の mRNA は減少していなかったが、生成されたフィラグリンの量は低下していた。

新規変異を有する患者皮膚から抽出した *FLG* mRNA はコントロールと比して有意な減少を認めなかった。しかし、組織学的には著明な顆粒層の低形成を認め、またフィラグリン染色では生成されたフィラグリンの量の低下を認めた。

【考察】日本人 AD 患者を *FLG* 変異の有無によって分け、*FLG* 変異を有する患者では皮膚のバリア機能と臨床的重症度が相関することを示した。*FLG* 変異を有さない患者においては、皮膚のバリア機能と臨床的重症度は相関を認めなかった。これらのパラメーターと重症度との相関が、*FLG* 変異を有する群のみで認められたことは、*FLG* 変異を有する群では、皮膚のバリア機能障害が基礎にあって、その機能障害が AD の発症に大きく関わっている可能性を示唆する。

また、過去に報告されている中で最も C 末端に近い *FLG* の新規遺伝子変異を発見した。*FLG* で報告されている変異は最後のエクソンにあるため nonsense-mediated mRNA decay は起きず、患者の変異アレルからは不完全なプロフィラグリンが生成される。新規変異を有していた患者皮膚による Real-time PCR においても mRNA 量には著変なかった。しかし、免疫組織学的に患者皮膚の顆粒層を形成するフィラグリンタンパクの減少を認めている。理論上、*FLG* の最も 3' 側に変異を持つアレルから完全なプロフィラグリンに最も近いペプチドが生成され、最も多くのフィラグリンが生成されるはずであるが、今回の研究ではこの変異を持つ患者も重症な AD 臨床像を示しており、変異間での臨床症状の差は特に認められなかった。本研究は C 末端の存在がフィラグリンの生成に不可欠であるという過去の報告を裏付けるものであった。

【結論】*FLG* 変異を有することは直接に皮膚のバリア機能低下をもたらして、AD の発症と重症化につながることを示された。また、ダニ、ハウスダストなどの経皮的感作も重要であることが示唆された。皮膚のバリア機能を把握することは AD の経過観察にも有用であると同時に、変異のある病児においては特に、早期から保湿剤を使用し

キンケアに努めることで、AD 発症と重症化を予防できる可能性があると考えた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山本	有平
副査	教授	清水	宏
副査	教授	寺沢	浩一
副査	教授	鎧	邦芳
副査	教授	松野	吉宏

学位論文題名

日本人アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子 変異と皮膚バリア機能障害に関する研究

アトピー性皮膚炎（AD）と近年発見された、皮膚バリア機能を司るフィラグリン遺伝子（*FLG*）変異についての一連の研究内容が発表された。

前半では日本人 AD 患者を *FLG* 変異の有無によって分け、*FLG* 変異を有する患者では皮膚のバリア機能と臨床的重症度が相関するのに対し、同変異を有さない患者では両者間に相関が認められなかったことが示された。*FLG* 変異を有する群では、皮膚のバリア機能障害が基礎にあって、その機能障害が AD の発症に大きく関わっている可能性が示唆されたという内容であった。後半では、過去に報告されている中で最も C 末端に近い *FLG* の新規遺伝子変異の発見が発表された。新規変異をもつ患者皮膚による Real-time RT-PCR において mRNA 量には著変ないのにも関わらず、免疫組織学的に患者皮膚の顆粒層を形成するフィラグリンタンパクの減少を認め、臨床的にも重症な AD 臨床像が示された。本研究は C 末端の存在がフィラグリンの生成に不可欠であるという過去の報告を裏付けるものであるという内容であった。

審査では *FLG* 変異によっておこる顆粒層の減少や角質厚の肥厚はフィラグリンが減少するためか、それとも異常なフィラグリンの生成が増えることによるのかと問われた。発表者からはフィラグリンが減少するためと回答があった。*FLG* 変異の有無で臨床像と組織像に特徴があるのか問われた。発表者からは臨床的には変異の有無を見分け難いこと、病理組織学的には変異のある群では顆粒層が減少、角質厚が増加するという回答があった。新規変異を有する AD 患者の一人（患者 A）においてはあまり角質厚が上昇していないことが指摘された。発表者からは当該患者はかつて AD 症状が強かったものの、現在改善しており、組織学的にも湿疹性病変は少なく、角質厚が増大していなかったという回答があった。*FLG* 変異の人種差の理由について問われた。発表者からは founder effect が考えられると回答があった。*FLG* 変異を有する患者で治療の注意点はあるのかが問われた。発表者から *FLG* 変異ある患者において経時的に皮膚バリア機能を評価すると、保湿の強化により皮疹が改善することが経験され、保湿を積極的に行うことで、湿疹性病変の軽快につながりやすい可能性があるという回答があった。患者の選び方について、平均年齢と分布について質問があった。発表者からは特に有意差がないように選んだと回答があった。角質水分量と TEWL の測定について

室内の状態に適応するとは具体的にはどのようなことかと質問があった。発表者からは脱衣し、衣服による影響をなくし、また被検者の緊張状態をなくしてから測定したという回答があった。Antigen retrieval とは何かとの質問があった。発表者からは高圧高温による処置により、抗原を露出し、良好に免疫染色する手法という回答があった。草木花粉とは何の草木由来かの質問があった。発表者からはスギであるという回答があった。角質厚の個人差について、精度はどうかとの質問があった。発表者からははっきりとした数字として精度を表すことはできないが、過去の魚鱗癬症候群患者における検討で、組織学的皮膚厚と機器を用いて求めた皮膚厚とが非常によく相関していたこと、また、ばらつきがでないように同じ験者により、同じ部位の皮膚にて測定するように努めたことが回答された。人種間の変異保有率の差において、環境要因の関与についての質問があった。発表者からは主に現在は欧州の報告が多いが、黒人での報告もあり、低温乾燥などの増悪因子と変異との関連は、今後検討が必要であるという回答があった。一般の中での *FLG* の変異の頻度についての質問があり、回答者からは欧州人の対照では 8% に変異がみられたという回答があった。AD を発症することにより *FLG* 変異を生じる可能性についての質問があった。回答者からは、まず遺伝性角化疾患である尋常性魚鱗癬で *FLG* 変異が報告されたことより、同疾患に合併することのある AD においても *FLG* 変異が発見された経緯があるため、まず変異ありきである可能性があるが、経時的にみたという報告はないため、否定はできないと回答があった。*FLG* 以外に AD に影響する変異はないかという質問があった。発表者からは他のバリア機能を司る分子の遺伝子多型などが研究されているものの、*FLG* ほどに決定的なものは現在のところ発見されていないという回答があった。

この論文は疾患の病態メカニズムを明らかにする重要な手掛かりを提起したといった点で高く評価され、今後の病態解明や治療法の開発などにつながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。